

# VU Research Portal

## Optical methods for structure elucidation of protein-ligand interactions

Tardioli, S.

2011

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Tardioli, S. (2011). *Optical methods for structure elucidation of protein-ligand interactions: fluorescence and ultraviolet resonance Raman spectroscopy*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

---

## Samenvatting

---

Inzicht krijgen in de manier waarop moleculen binden aan eiwitten is een enorme en fascinerende uitdaging. Het werk dat in dit proefschrift: “Optische methodes voor de opheldering van de structuur van eiwit–ligand interacties: een fluorescentie en UV Raman spectroscopische studie” wordt beschreven, is gewijd aan een spectroscopische karakterisering van drie belangrijke antihistamines, tripelennamine, mepyrarime en brompheniramine, en het mechanisme van hun binding aan het menselijk serum albumine HSA. De mogelijkheid om met behulp van een combinatie van luminescentie, in het bijzonder fluorescentie, en Raman spectroscopie in het ultraviolet, inzicht te krijgen in dergelijke eiwit–ligand interacties is voor het eerst onderzocht met bovengenoemde moleculen.

Antihistamines zijn medicijnen die breed worden ingezet bij menselijke aandoeningen. Ze oefenen hun werking uit door interactie met de histamine receptor. Niettemin is er nog slechts beperkte informatie over hoe de binding aan de receptor precies plaatsvindt, en wat daarvan de directe gevolgen zijn op moleculair niveau. De bestudeerde antihistamines werken ook op het centrale zenuwstelsel, waar ze slaperigheid veroorzaken, tengevolge van hun zwakke binding aan HSA. Daardoor zijn ze in staat tot de hersenen door te dringen. Ook met betrekking tot binding aan HSA is nog slechts beperkt in-

formatie beschikbaar. Om inzicht te krijgen in de soort interacties die van belang zijn voor de binding was één van de doelen van deze studie, evenals de mogelijkheid te onderzoeken of de genoemde verbindingen bruikbaar zouden zijn bij de studie van binding aan eiwitten. Dit soort informatie is van groot belang bij het ontwikkelen van nieuwe drugs en therapieën.

Toen begonnen werd met dit onderzoek was nog slechts een beperkte hoeveelheid informatie beschikbaar over de spectroscopische eigenschappen van de genoemde antihistamines. In de zeventiger jaren van de vorige eeuw zijn enkele studies gepubliceerd waarin een aantal anomalieën werden gerapporteerd, zonder dat daarvoor een goede verklaring kon worden gegeven. Moleculen gebruiken om interacties met eiwitten te bestuderen vereist grondige kennis van hun gedrag in oplossing. Daarom wordt in het eerste deel van dit proefschrift een aanzienlijke hoeveelheid aandacht besteed aan de spectroscopische karakterisering, en opheldering van de structuur, in water bij verschillende pH waarden. Het is bekend dat de bindingseigenschappen van deze antihistamines sterk van de pH afhankelijk zijn omdat ionische interacties met groepen in het eiwit een belangrijke rol spelen.

De antihistamines bevatten allen een aantal groepen waaraan protonen kunnen binden. De waarde van de pH bepaalt welke van de groepen een proton bevatten, en welke ongeprotoneerd zijn. De belangrijkste van deze groepen, die bij alle drie genoemde antihistamines voorkomt, is een zogenaamde alkylamino staart die juist in het belangrijke pH gebied een proton kan opnemen of afstaan. Bij twee van de antihistamines, tripelennamine en mepyramine kan, als de staart geprotoneerd is, een interne brug in het molecuul worden gevormd die binding aan een eiwit moeilijker maakt. Bij brompheniramine kan dat niet. Door een combinatie van technieken die in dit proefschrift uitgebreid worden beschreven zijn we in staat gebleken met behulp van absorptie, emissie en Raman verstrooiing te bepalen met welke van de vorm van deze moleculen we onder de verschillende omstandigheden te maken hebben. Het zou daardoor dan ook in principe mogelijk worden te zien welke van de vormen aan eiwit bindt.

---

Omdat de histamine receptor zelf nog niet in voldoende zuivere vorm geproduceerd kan worden, is binding aan een ander eiwit, HSA, bestudeerd. De methodes die hierbij ontwikkeld zijn en nog verder ontwikkeld kunnen worden, zijn algemeen genoeg om als leidraad te dienen bij latere bindingsstudies aan histamine receptoren. Een belangrijk onderdeel van HSA, het aminozuur tryptofaan, dat bij de bindingsplaats voor de antihistamines zit, komt ook in de receptor voor. De gebruikte antihistamines waren in eerste instantie geselecteerd op hun optische eigenschappen, waarbij er speciaal op was gelet dat ze onafhankelijk van tryptofaan zouden kunnen worden geobserveerd. Omdat tryptofaan ook zelf fluoresceert, en een goede Raman verstrooier is, is het zinvol te zoeken naar moleculen waarvan de eigenschappen voldoende verschillen van tryptofaan, zonder dat dat de eiwitstructuur op ongeoorloofde wijze beïnvloedt bij binding. Bij de studie van binding aan HSA werd aangetoond dat de aanwezigheid van meerdere conformeren inderdaad een belangrijke rol speelt in het bindingsgedrag van deze moleculen. Verder konden ook details worden opgehelderd over specifiek moleculair gedrag, zoals de vorming van waterstofbruggen, verandering van omgevingspolariteit, en, inderdaad, welke van de conformeren van de antihistamines goed aan het eiwit binden. De kennis die we met dit systeem hebben vergaard zal ongetwijfeld een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan toekomstige studies van binding aan de receptor zelf als die in voldoende hoeveelheid, en voldoende zuiver, ter beschikking komt.

